动 物 学 研 究 2007, Oct. 28(5): 470－476 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research

DNA 甲基化对牛 *Igf-2r* 表达的影响及其在克隆牛发育中的作用

蔡 霞，龙健儿*

（上海交通大学附属儿童医院 医学遗传研究所, 上海 200040）

摘要：目前认为克隆效率低的主要原因是供体核的不完全重编程导致发育过程中一些重要的基因异常表达。运用 DNA 甲基化转移酶抑制剂 5′-脱氧胞苷（5′-azacytidine，5′-aza）处理 MDBK 细胞（牛肾上皮细胞），并通过实时荧光定量 PCR 方法对 *Igf-2r* 基因的表达进行了定量分析；在此基础上，应用亚硫酸盐甲基化测序法检测正常牛及克隆牛脑、肺、心、肝组织 *Igf-2r* 印迹调控区 DMR 2（DNA differentially methylated region，DMR）及非印迹调控区 3′-UTR（3′-untranslated region，UTR）的 DNA 甲基化水平。研究发现，5′-aza 处理 MDBK 细胞后，*Igf-2r* 基因的表达上调。正常牛各组织中 *Igf-2r* DMR 2 区的 DNA 甲基化程度差异较大，3′-UTR 区较稳定；与正常牛相比，克隆牛 DMR 2 区的甲基化程度变化较大，3′-UTR 区无显著性变化。结果表明，DNA 甲基化修饰影响 *Igf-2r* 基因的表达。正常牛不同组织中 *Igf-2r* 基因 DMR 2 区的 DNA 甲基化程度不同，提示 *Igf-2r* 基因的印迹调控方式在不同组织中可能不同。克隆牛发育过程中，调控 *Igf-2r* 基因印迹的 DMR 2 表观结构被明显改变，而非印迹调控区 3′-UTR 则无明显变化，提示 *Igf-2r* 基因印迹调控区被破坏，很可能是导致克隆牛发育异常的一个重要原因。

关键词：*Igf-2r*；表观遗传；克隆牛；DNA 甲基化；基因印迹
中图分类号：Q34; Q523 **文献标识码**：A **文章编号**：0254-5853-(2007)05-0470-07

Effect of DNA Methylation on *Igf-2r* Expression in the Development of Cloned Cattle

CAI Xia, LONG Jian-er*

(*Shanghai Children's Hospital, Institute of Medical Genetics, Shanghai Jiaotong University, Shanghai* 200040, *China*)

Abstract：Epigenetic reprogramming has a crucial role in establishing nuclear totipotency in normal development and in cloned animals. In the current study, the method of real-time fluorescent quantitative PCR (FQ-PCR) was applied to detect *Igf2r* mRNA in Madin–Darby bovine kidney（MDBK ）cells after being treated with 5′-azacytidine (5′-aza, a DNA methyltransferase inhibitor). And then we used the method of Bisulfite DNA Sequencing to detect DNA methylation status of *Igf-2r* DMR 2（DNA differentially methylated region，DMR）and 3′UTR（3′-untranslated region，UTR）in several tissues, such as brain, liver, lung, and heart in normal and cloned cattle.The results suggested that *Igf2r* mRNA were up-regulated in MDBK cells after being treated with 5′-aza. DNA methylation at DMR 2 significantly varied in normal cattle tissues but without significant variation at *Igf-2r* 3′-UTR. DNA methylation at *Igf-2r* DMR2 in cloned cattle was markedly altered compared with a normal fetus, while it was similar to a normal fetus at *Igf-2r* 3′-UTR. Based on these results, it is suggested that DNA methylation inhibitor down-regulated the expression of *Igf-2r* in MDBK cells. In normal cattle, patterns of DNA methylation at *Igf-2r* DMR2 was variable in different tissues, suggesting that the mechanism of gene imprinting was differently regulated in these tissues. The results also showed that in cloned cattle, *Igf-2r* DMR2 DNA methylation was disrupted while the non-imprinting control region (3′-UTR) was not. It suggested that disruption of the gene imprinting control region was likely to result in the abnormalities of cloned cattle.

Key words：*Igf-2r;* Epigenetics; Cloned cattle; DNA methylation; Gene imprinting

克隆技术的发展与应用对动物生产及医药工业等有重要意义（Wall et al, 1997; Wilmut, 1998; Stice et al, 1998）。但实施过程中需要对胚胎进行多种体外操作，由此经常出现心肺发育不全、胎儿过大等现象，这极大地限制了胚胎体外生产、核移植等技术的大规模应用。目前认为供体核的不完全重

收稿日期：2007-04-09；接受日期：2007-08-27
基金项目：国家自然科学基金资助项目(30500301)
* 通讯作者（Corresponding author），E-mail:long_jianer@yahoo.com.cn

编程（reprogramming），导致在发育过程中一些重要的基因表达异常，是克隆效率低的主要原因（Daniels et al, 2000; Jaenich et al, 2005）。目前关于供体核表观遗传修饰（epigenetic modification）重编程的研究主要集中在 DNA 甲基化（DNA methylation）、组蛋白乙酰化（histone acetylation）、基因印迹（gene imprinting）等方面，其中 DNA 甲基化是主要的表观遗传修饰方式。

研究表明，敲除 *Igf-2r* 基因后，小鼠出现过度生长（Barlow et al, 1991）、心脏和胎盘发育异常等现象（Wang et al, 1994; Ludwig et al, 1996），与动物克隆中出现的异常现象相似。胰岛素样生长因子-2 受体（insulin-like growth factor-2 receptor，*IGF-2R*）为多结构域跨膜糖蛋白。小鼠模型显示，*Igf-2r* 基因在外周组织中为父源性印迹（paternal imprinting）、母源性等位基因表达。*Igf-2r* 印迹受两个 DNA 甲基化差异修饰区（DNA differentially methylated region，DMR）调控，DMR 1 位于基因启动子和外显子 1 前端，DMR 2 位于内含子 2 内（Sleutels et al, 2002; Herman et al, 2003），其中 DMR 2 区为主要甲基化差异修饰区。研究显示，不同的哺乳动物，*Igf-2r* 基因 DMR 区的结构不尽相同，因此其印迹调控机制可能并不相同（Hu et al, 2003），而牛 *Igf-2r* 基因 DMR 区的结构及其印迹机制尚不明确。

本研究检测了经 DNA 甲基转移酶抑制剂处理后 MDBK 细胞 *Igf-2r* mRNA 的表达情况。并运用亚硫酸盐甲基化测序法，检测了克隆牛不同组织 *Igf-2r* 的 DNA 甲基化情况，以探索 *Igf-2r* 基因表观修饰在克隆牛发育过程中的作用。

1　材料和方法

1.1　牛 *Igf-2r* 基因 DMR 2 序列克隆及分析

通过分析牛基因组序列（The Human Genome Sequencing Center，http://www. hgsc. bcm.tmc.edu/ projects/bovine/），及牛 *Igf-2r* mRNA（AF342811），发现牛 *Igf-2r* 基因内含子 2 中尚有 3 个缺口（gap）序列未知。为了分析 *Igf-2r* 内含子 2 序列是否存在 DMR 2 结构，我们设计 3 对引物以填补缺口（图 1a，表 1），gap 1 运用染色体步行的方法进行扩增，gap 2、gap 3 运用 PCR 方法进行扩增。应用蛋白酶 K 和苯酚抽提牛肝脏组织DNA，分别取 500 ng DNA 进行 PCR 反应以填补缺口。gap 1 按 LA PCR *in vitro* Cloning Kit（TaKaRa）进行操作，PCR 反应条件为：94℃ 30s，55℃ 2min，72℃ 90s，30 个循环。gap 2、gap 3 PCR 反应体系：10×Buffer（无 Mg^{2+}）5µL，$MgCl_2$（25mmol/L）5µL，dNTP mix（2.5mmol/L）5µL，DMSO（二甲基亚砜）2µL，BSA（牛血清白蛋白）0.5µL，Sense Primer（10µmol/L）1µL，Anti-sense Primer（10µmol/L）1µL，Taq E（5U/µL）0.25µL，DNA 500ng，补充 H_2O 至 50µL。反应条件：94℃ 4min；94℃ 60s，65℃（每个循环下降 0.5℃）60s，72℃ 90s，10 个循环；94℃ 60s，60℃ 60s，72℃ 90s，20 个循环；72℃ 10min。扩增产物回收纯化后连入 pGEM-T（Promega）载体，取阳性克隆送上海鼎安生物科技有限公司测序。测序后应用 CpGPLOT 软件（http://inn.weizmann.ac.il/ EMBOSS/）对牛 *Igf-2r* 基因的内含子 2 进行 CpG 岛分析（CpG 岛的搜索条件为：观察值与期望值的比率（observed/expected ratio）>0.60；C+G>50%；长度>200 bp 即定义为一个 CpG 岛）。

1.2　MDBK 细胞培养及 5′-aza、处理 MDBK 细胞

MDBK 细胞（Madin-Darby bovine kidney，牛肾上皮细胞，ATCC）贴壁生长于 1640 培养基（Gibco）中（含小牛血清 10%，青链霉素 100 U/mL），于 37℃、5% CO_2 饱和湿度箱中培养。取对数生长期细胞传代，使各培养皿（9cm 培养皿）含有 1×10^6 个细胞。24h 细胞贴壁后，加入 DNA 甲基转移酶抑制剂 5′-脱氧胞苷（5′-aza，Sigma）。5′-aza 终浓度分别为 0.5 µmol/L 和 50 µmol/L，每 24h 更换培养基，并再次加入 5′-aza，处理 48h 后，换上无药培养基继续培养 24 h 后收细胞。

1.3　*Igf-2r* 基因 mRNA 定量分析

应用 TRIzol（Invitrogen）抽提上述细胞 RNA 后进行逆转录，取 1 µg RNA，加入random hexamers（随机六聚体，50ng/µL，Invitrogen）1 µL，5× buffer 4 µL，dNTP mix（2.5mmol/L）4 µL，RNA guard（400U/mL，Pharmacia）0.5 µL，DTT（二硫苏糖醇，0.1mol/L）0.5 µL，M-MLV（鼠白血病病毒反转录酶，Takara）200U，补充 DEPC 水至 20 µL，于 37℃反应 1h。取 5 µL 逆转录产物进行实时荧光定量 PCR 反应。*Igf-2r* 荧光探针及引物（表 1）由上海基康生物科技有限公司合成。PCR 上游引物位于 *Igf-2r* 基因外显子 36 处，下游引物位于外显子

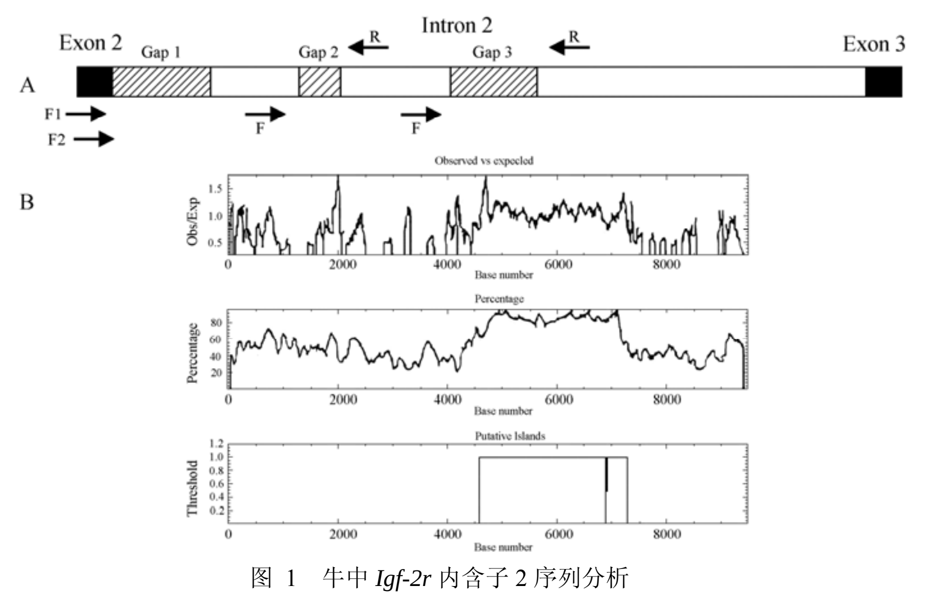


图 1 牛中 *Igf-2r* 内含子 2 序列分析

Fig. 1 Sequencing and analysis of cattle *Igf-2r* intron 2

(A) *Igf-2r* 内含子 2 中 3 个未知序列的克隆。黑框中为未知序列；箭头为引物在 *Igf-2r* contig (NW_932252)位置。(B) *Igf-2r* 内含子 2 中 CpG 分析。应用 CpGPLOT 软件对牛 *Igf-2r* 基因的内含子 2 进行 CpG 岛分析，CpG 岛索条件为：observed/expected ratio>0.60；C%+G%>50%；长度>200 bp。

(A) Strategy for cloning three unknown-sequence gaps within *Igf-2r* intron 2. Closed boxes mean unknown-sequence gaps; arrows mean primers located at the *Igf-2r* contig (NW_932252). (B) CpG islands within *Igf-2r* intron 2. CpG island was searched by the software of CpGplot with the condition of Obs/Exp ratio>0.60, C%+G%>50% and minimal size window >200 bp.

37 处，探针标记 FAM 荧光，跨过两个外显子。反应体系为：10×PCR Buffer（无 Mg^{2+}）2.5 μL，$MgCl_2$（25 mmol/L）2.5 μL，dNTP mix（2.5 mmol/L）2.5 μL，Sense Primer（正向引物，10 μmol/L）1 μL，Anti-sense Primer（反向引物，10 μmol/L）1 μL，Taqman 探针（10 μmol/L）1 μL，Taq E（耐热性 DNA 聚合酶，5 U/μL，TaKaRa）0.25 μL，cDNA 模板 5 μL，补充 H_2O 至 25 μL。其中标准品反应管中分别加入不同拷贝数的 *Igf-2r* 标准品（表 1）。反应条件：94℃ 4 min；94℃ 60 s，60℃ 60 s，72℃ 30 s，35 个循环。利用 RG3000（Corbett Research）定量 PCR 仪及 Rotor-gene 5 软件进行定量 PCR 反应及分析。

1.4 牛 *Igf-2r* 基因 DNA 甲基化分析

正常牛组织取自出生后处死的正常小牛；克隆牛经上海基因生物科技有限公司通过 DNA 指纹方法鉴定，其中 1—3 号牛供核细胞为颗粒细胞，4—5 号牛供核细胞为牛耳成纤维细胞，组织多部位采样后保存于－70℃。应用蛋白酶 K 和饱和酚/氯仿抽提各牛脑、肺、心、肝四种器官的基因组 DNA 并进行 *EcoR* Ⅰ酶切反应。分别取反应产物 2 μg，加入 5.5 μL 2 mol/L NaOH，置于 37℃ 30 min，使 DNA 变性后加入新鲜配制 30 μL 10 mmol/L 的氢醌（Sigma）及 520 μL 3 mol/L 的亚硫酸钠（Sigma），55℃水浴脱氨基 16 h。Wizard DNA Clean-up（Promega）纯化。加入 1 μL glycogen（20 mg/mL），33 μL 10 mol/L NH_4AC，3 倍体积的无水乙醇沉淀后取 5 μL 产物进行 PCR 扩增。应用 MethPrimer 软件（http: //www. ucsf . edu/urogene/ methprimer/）设计 DNA 甲基化分析引物。通过 PCR 分别扩增 DMR 2 及 3′-UTR（位于外显子 48）甲基化检测片段（表 1）。PCR 反应条件：94℃ 4 min；94℃ 45 s，55℃（每个循环下降 0.5℃）45 s，72℃ 30 s，10 个循环；94℃ 45 s，50℃ 45 s，72℃ 30 s，20 个循环；72℃ 10 min。扩增产物回收纯化后连入 pGEM-T 载体，取阳性克隆测序，根据甲基化的胞嘧啶 C 在亚硫酸盐和氢醌处理后不被转化为胸腺嘧啶 T 的原理，确定 CpG 是否被甲基化及其位置。

2 结 果

2.1 牛 *Igf-2r* 内含子 2 序列克隆及分析

为了研究 *Igf-2r* 内含子 2 中是否存在 DMR 结

表 1　*Igf-2r* mRNA 定量、*Igf-2r* 内含子 2 缺口填充及 DMR 2 和 3′-UTR 亚硫酸盐处理后 DNA 扩增引物

Tab. 1　Primers for FQ-PCR quantification of *Igf-2r* mRNA, for gaps within *Igf-2r* intron 2, and for DMR2 and 3′-UTR after DNA treated with bisulphate

基因 Gene	登录号 Accession number	长度 Length (bp)	引物位置 Primer Location		序列 Sequences
Igf-2r[a]	AF342811	282	Sense	5429－5463	5′-CTTGGCGGACCGGCACTTCAACTACACCTCACTGA-3′
			Anti-sense	5678－5710	5′-CCTGCGGCTGCGGTGCACACCCCCACACTGTAG-3′
Igf-2r	AF342811	96	Sense	5458－5481	5′-CACTGATCACGTTCCACTGTAAGC-3′
			Anti-sense	5530－5553	5′-GAGTCTCCCACTCAAACACGAAGT-3′
			Probe[b]	5486－5509	5′-FAGTTTTGGCGTTCCCATGCTCACG-3′
gap1（*Igf-2r* Intron 2）	NW_932252	—	Sense-1	922－945	5′-TATACATGGGAAGCAGTGGATACCAAAAATAACA-3′
			Sense-2	1688－1707	5′-GTGTTGCCCAGTGTGGACCATCAAGTGCT-3′
gap2（*Igf-2r* Intron 2）	NW_932252	—	Sense	2708－2732	5′-GCAGGAGCAAAATGGCAAAGTCTC-3′
			Anti-sense	3140－3166	5′-GAACCAAATGATTGTTCACTGACCCC-3′
gap3（*Igf-2r* Intron 2）	NW_932252	—	Sense	5108－5128	5′-GCTGCAGAGCGTGGCTGGGT-3′
			Anti-sense	5997－6017	5′-AGACCAGCTCGCGCTCACCG-3′
Igf-2r DMR 2（for methylation）	DQ835615	347	Sense	4439－4465	5′-CTACTTTCAATTTCAAATCTTTACTCA-3′
			Anti-sense	4761－4785	5′-ACACCTTACTCAAAACCTACCAACC-3′
Igf-2r 3′UTR（for methylation）	AF342811	207	Sense	7698－7722	5′-ACTTCTATCCTTAACCTTTAACGAA-3′
			Anti-sense	7884－7904	5′-TTTTAAGACGCGTTTGGTTTC-3′

[a] *Igf-2r* mRNA 定量标准曲线引物；[b] 探针标记 FAM 荧光。

[a] DNA amplified for calibration of standard curve when quantified *Igf-2r* mRNA；[b] probe labeled with FAM fluorescence.

构，我们分别运用了染色体步行及 PCR 扩增的方法得到牛 *Igf-2r* 基因内含子 2 中 3 个 gap 序列(图 1A)。与 *Igf-2r* 基因及牛第 9 号染色体序列比对发现内含子 2 全长 9385 bp，gap 1 长 1020 bp，gap 2 长 39 bp，gap 3 长 445 bp。应用 CpGPLOT 软件分析发现，牛 *Igf-2r* 基因内含子 2 中存在两个 CpG 岛，分别位于内含子 2 的第 4559－6787 位及 6797－7179 位，长度分别为 2229 bp 和 383 bp，在 4 559—7 179 的片段中，G+C 占 75.7%（图 1B）。同时分析比较其他物种中 *Igf-2r* 基因内含子 2 发现：小鼠（*Mus musculus*）中存在 3 个 CpG 岛；树猴（*Tupaia glis*）存在两个 CpG 岛；人类中存在两个 CpG 岛；而在北美负鼠（*Didelphis virginiana*）、鸡（*Gallus gallus*）、响尾猴（*Lemur catta*）等动物中则没有类似的结构出现。

2.2　DNA 甲基化对牛 *Igf-2r* 基因表达的影响

为了研究 DNA 甲基化对牛 *Igf-2r* 基因表达的影响，我们运用实时荧光定量 PCR 方法分别测定未经药物处理，以及加入不同浓度 5′-aza 处理的 MDBK 细胞中 *Igf-2r* 基因 mRNA 的表达情况。结果显示，浓度为 0.5 μmol/L 和 50 μmol/L 5′-aza 细胞处理组中 *Igf-2r* 基因的 mRNA 拷贝数均高于对照组（1.42×10^7 拷贝/μg RNA），分别为 2.26×10^7 拷贝/μg RNA 和 48.47×10^7 拷贝/μg RNA（图 2）。

2.3　牛 *Igf-2r* 基因的 DNA 甲基化分析

2.3.1　牛 *Igf-2r* 基因 DMR 2 甲基化分析　为了解牛 *Igf-2r* 基因 DMR 2 甲基化是否对克隆牛的发育产生影响，我们应用亚硫酸盐测序的方法分别对 1 头正常牛和 5 头克隆牛的脑、肺、心、肝 4 个脏器 *Igf-2r* 基因 DMR 2 区的 DNA 甲基化水平进行分析。各组织分别挑出 10 个左右的阳性克隆测序。在检测的 347 bp 的片段中发现 26 个甲基化位点(图 3A，表 2)，该区的甲基化程度差异较大。正常牛中：脑和肝的甲基化水平相似，甲基化率分别为 99.2%（脑）和 89.2%（肝）；心和肺的甲基化程度相似，甲基化率分别为 54.6%（心）和 61.2%（肺）。克隆牛与正常牛相比，各个脏器的甲基化程度变化较大：脑组织中，4 头克隆牛（1、2、4、5 号）甲基化程度较低，

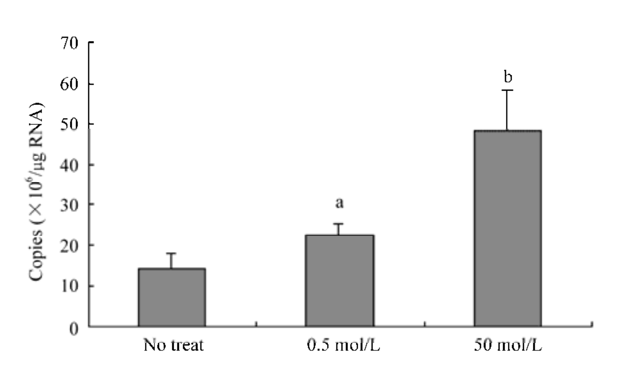


图 2 MDBK 细胞经 5′-azacytidine（5′-aza）处理后 Igf-2r mRNA 定量分析

Fig. 2 Quantification of Igf-2r mRNA by real-time fluorescent quantitative PCR in MDBK cells treated with 5′-azacytidine（5′-aza）

5′-aza 处理 MDBK 细胞，浓度为 0.5 μmol/L 和 50 μmol/L，处理 48 h。实验重复 3 次，与未经处理的对照组相比，a: P<0.05; b: P<0.05。

MDBK cells were treated with 5′-aza at 0.5 or 50 μmol/L for 48 h. The experiment was independently repeated three times, i.e. n=3. a: P<0.05; b: P<0.05, compared with the cells without treatment.

甲基化率分别为 46.9%、61.1%、56.8%、33.9%；肝组织中 5 头克隆牛甲基化程度均较低，分别为：62.3%、39.2%、59.7%、35.7%、61.5%；肺组织中，3 头克隆牛（1、3、4 号）甲基化程度较高，分别为：91.2%、97.7%、95.4%；心脏中，5 号克隆牛的甲基化程度较低，为 25.2%，而 1、3、4 号克隆牛的甲基化程度较高，分别为 81.9%、73.5%、71.5%。

2.3.2 牛 *Igf-2r* 基因 3′-UTR 甲基化分析 应用亚硫酸盐测序的方法对牛脑、肺、心、肝四个器官 *Igf-2r* 基因 3′-UTR 的 DNA 甲基化水平进行分析。各组织分别挑出 10 个左右的阳性克隆测序。在检测的 207 bp 的片段中发现 18 个甲基化位点(图 3B，表 2)，在四个组织中该区的甲基化水平变化较小。正常牛中，脑、肺、心、肝的甲基化率分别为：96.5%、93.9%、93.9%、94.4%。克隆牛与正常牛相比，甲基化程度变化不大。5 头克隆牛中，脑组织的甲基化率介于 94.4%—96.2%之间；肺为 92.3%—96.1%；心为 91.6%—95.6%；肝为 94.4%—97.8%。

3 讨 论

IGF-2r 为胰岛素样生长因子-2 受体。人 *Igf-2r* 基因长约 136 kb 位于第 6 号染色体，含 48 个外显子，在大部分组织中表达，但其表达水平受组织特异性和发育阶段性调控（Matzner et al, 1992）。小鼠 *Igf-2r* 基因位于第 17 号染色体(Killian et al, 1999; Geneviève et al, 1988），在外围组织中为父源性印迹、母源性等位基因表达，而在中枢神经系统中双亲等位基因均表达。这些研究结果均提示在不同物种以及同一物种的不同组织中，*Igf-2r* 基因印迹调

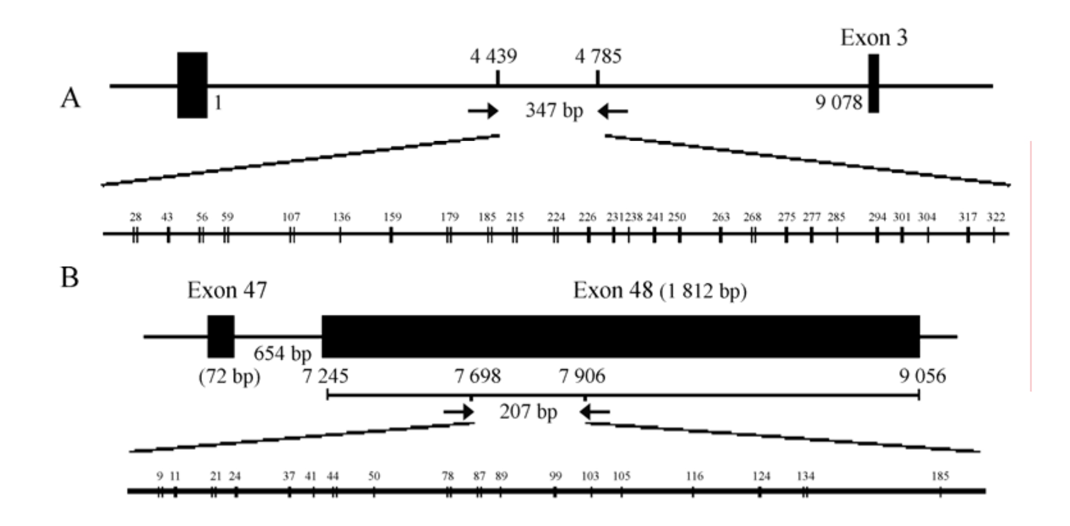


图 3 牛 *Igf-2r* DMR 2 及 3′-UTR DNA 甲基化位点分析

Fig. 3 CpG sites at *Igf-2r* DMR 2 and 3′-UTR in cattle

(A)经亚硫酸盐处理后，在 DMR2 中扩增 347 bp 片段，其中的 DNA 甲基化位点；(B)经亚硫酸盐处理后，在 3′-UTR 中扩增 207bp 片段，其中的 DNA 甲基化位点。

(A) Schematic representation of DMR2, converted by bisulphate and a fragment in size of 347bp was amplified for determination of DNA methylation. (B) Schematic representation of 3′-UTR, converted by bisulphate and a fragment in size of 207bp was amplified for determination of DNA methylation.

表 2　牛 *Igf-2r* DMR 2 和 3′-UTR 区 CpG DNA 甲基化百分比

Tab. 2　Percentage of DNA methylated CpGs at *Igf-2r* DMR 2 and 3′-UTR in cattle*

组织 Tissue	基因片段 Gene fragment	DNA 甲基化的 CpG　DNA methylated CpGs (%)					
		Normal	Clone 1	Clone 2	Clone 3	Clone 4	Clone 5
肝 Liver	DMR 2	89.2	62.3	39.2	59.7	35.7	61.54
	3′-UTR	94.4	94.4	97.8	96.2	95.5	96.1
脑 Brain	DMR 2	99.2	46.9	61.1	82.7	56.8	33.9
	3′-UTR	96.5	94.4	93.9	96.2	95.5	95.5
心 Heart	DMR 2	54.6	81.9	41.2	73.5	71.5	25.2
	3′-UTR	93.9	91.6	91.7	95.6	92.8	93.9
肺 Lung	DMR 2	61.2	91.2	68.1	97.7	95.4	67.3
	3′-UTR	93.9	96.1	95.5	95.0	94.5	92.3

*DNA 甲基化的 CpG 岛百分比为：在检测的样品中，甲基化的 CpG 岛比所有检测样品中 CpG 岛。

*Percentage of DNA methylated CpGs was defined as all of CpGs in the detected clones divided by the number of methylated CpGs.

控的方式不完全相同。基因印迹是胎生哺乳动物普遍存在的表观遗传现象，印迹的消除和重建与 DNA 的甲基化水平密切相关。*Igf-2r* 基因印迹受其 DNA 甲基化差异修饰区即 DMR 区调控。DMR 区通常 GC 含量高，形成 CpG 岛(CpG island)。在大多数物种中，*Igf-2r* 基因含有两个 DMR 区，DMR1 位于基因启动子和外显子 1 前端，DMR2 位于内含子 2 内（Sleutels et al, 2002; Herman et al, 2003）。但不同物种 *Igf-2r* 基因内含子 2 的结构并不相同（Herman et al, 2003; Killian et al, 2001）。如小鼠、树猴、人的内含子 2 中含有 CpG 岛，这些物种主要通过 CpG 岛的甲基化差异进行印迹调控。而北美负鼠、鸡、响尾猴等，内含子 2 中没有 CpG 岛，因此 *Igf-2r* 基因不被印迹。在牛的 *Igf-2r* 基因的内含子 2 中我们检测发现了 2 个 CpG 岛，提示牛 *Igf-2r* 基因的内含子 2 结构与小鼠相类似。我们检测精子 *Igf-2r* 基因的 DNA 甲基化时，发现该区 DNA 基本不被甲基化（结果未显示），因此认为这些 CpG 岛为 DNA 甲基化差异修饰区即 DMR 区，对 *Igf-2r* 基因进行基因印迹调控。

研究表明，*IGF-2r* 与动物的生长发育有关。Barlow 等首先证明 *IGF-2r* 在生长发育中起作用，*IGF-2r* 功能缺失后小鼠出现过度生长（Barlow et al, 1991）。Wylie 等（Andrew et al, 2003）用组成性启动子驱动 Cre 表达来破坏 *Igf-2r* 基因，同样观察到类似的胚胎过度生长和致死现象，从而进一步证实了 *Igf-2r* 基因在胚胎发育中的重要作用。最近，Lorraine 等在对克隆羊的研究中发现，胎羊过度肥大和围产期死亡很可能与 *Igf-2r* 基因 DMR 区甲基化程度的改变，从而导致 *Igf-2r* 基因表达异常有关（Lorraine et al, 2001）。这一结果提示，*Igf-2r* 基因 DMR 区甲基化程度的改变，致使 *Igf-2r* 基因表达异常，可能是大动物克隆过程经常出现胎儿过度肥大和围产期死亡现象的原因之一。本研究在克隆牛中也发现了类似的现象。在对克隆牛的不同器官 *Igf-2r* 基因的 DNA 甲基化情况进行检测后发现，克隆牛 DMR 2 区的甲基化程度与正常牛相比有不同程度的差异。如在肺中，3 头克隆牛甲基化程度高于正常牛，而在肝组织中，5 头克隆牛甲基化水平均低于正常牛。推测在克隆牛中，DNA 甲基化的改变可能是导致其发育异常的重要原因之一，而这种异常的甲基化水平很可能与其植入前胚胎的 DNA 甲基化重编程不充分有关。进一步发现，在一些克隆牛组织中，*Igf-2r* 基因 DMR 2 区的 DNA 甲基化水平、mRNA 的表达水平以及组织的病理情况相对应（结果未列出）。例如，1 号牛肝中 *Igf-2r* DMR 2 的甲基化水平、mRNA 表达量均明显低于正常，并出现肝坏死；5 号牛心脏 *Igf-2r* DMR 2 的甲基化水平、mRNA 表达量也明显低于正常水平，并出现了心肌肥大的现象。推测 *Igf-2r* 基因在牛发育早期的异常表观修饰可能是导致这些器官的发育及功能异常的原因之一。但在一些组织中这种对应现象并不明显，表明 *Igf-2r* 基因的表达不仅受其 DMR 2 区的调控，还可能与其它调控元件如 DMR 1，Air

（Antisense RNA），组蛋白密码以及其它一些相关的基因和调控因子共同作用，导致了克隆牛发育的异常。具体机理还需进一步研究。

致谢：感谢上海交通大学附属医学遗传研究所曾溢滔教授对本研究的评论，任兆瑞教授对本文的修订。

参考文献：

Wylie AA, Pulford DJ, McVie-Wylie AJ, Waterland RA, Evans HK, Chen YT, Nolan CM, Orton TC, Jirtle RL. 2003. Tissuespecific inactivation of murine M6P/IGF2R［J］. *Am J Pathol*, **162**(1): 321-328.

Barlow DP, Stoger R, Herrmann BG, Saito K, Schweifer N. 1991. The mouse insulin-like growth factor-type 2 receptor is imprinted and closely linked to the Tme locus［J］. *Nature*, **349**: 84-87.

Daniels R, Hall V, Trounson AO. 2000. Analysis of gene transcription in bovine nuclear transfer embryos reconstructed with granulosa cell nuclei［J］. *Biol Reprod*, **63**: 1034-1040.

Geneviève Laureys, David E Barton, Axel Ullrich, Uta Francke. 1988. Chromosomal mapping of the gene for the typeⅡ insulin-like growth factor receptor/cation-independent mannose 6-phosphate receptor in man and mouse［J］. *Genomics*, **3**(3): 224-229.

Herman H, Lu M, Anggraini M, Sikora A, Chang Y, Yoon BJ, Soloway PD. 2003. Trans allele methylation and paramutation-like effects in mice[J]. *Nat Genet,* **34**: 199-202.

Hu JF, Pham J, Dey I, Li T, Vu TH, Hoffman AR. 2000. Allele-specific histone acetylation accompanies genomic imprinting of the insulin-like growth factor Ⅱ receptor gene［J］. *Endocrinology*, **141**: 4428-4435.

Jaenisch R, Hochedlinger K, Eggan K. 2005. Nuclear cloning, epigenetic reprogramming and cellular differentiation［J］. *Novartis Found Symp*, **265**: 107-118.

Killian JK, Jirtle RL. 1999. Genomic structure of the human M6P/IGF2 receptor［J］. *Mamm Genome*, **10**(1): 74-77.

Killian JK, Nolan CM, Wylie AA, Li T, Vu TH, Hoffman AR, Jirtle RL. 2001. Divergent evolution in M6P/IGF2R imprinting from Jurassic to Quaternary［J］. *Hum Mol Genet*, **10**: 1721-1728.

Ludwig T, Eggenschwiler J, Fisher P, D'Ercole AJ, Davenport ML, Efstratiadis A. 1996. Mouse mutants lacking the type 2 IGF receptor (*IGF-2R*) are rescued from perinatal lethality in Igf2 and Igf1r null backgrounds［J］. *Dev Biol*, **177**: 517-535.

Matzner U, vonFigura K, Pohlmann R. 1992. Expression of the two mannose 6-phosphate receptors is spatially and temporally different during mouse embryogenesis［J］. *Development*, **114**(4): 965-972.

Sleutels F, Zwart R, Barlow DP. 2002. The non-coding Air RNA is required for silencing autosomal imprinted genes［J］. *Nature*, 415: 810-813.

Stice SL, Robl JM, Ponce de Leon FA, Jerry J, Golueke PG, Cibelli JB, Kane JJ. 1998. Cloning: New breakthroughs leading to commercial opportunities［J］. *Theriogenology*, **49**: 129-138.

Wall RJ, Kerr DE, Bondioli KR. 1997. Transgenic dairy cattle: Genetic engineering on a large scale［J］. *J Dairy Sci*, **80** : 2213-2224.

Wang ZQ, Fung MR, Barlow DP, Wagner EF. 1994. Regulation of embryonic growth and lysosomal targeting by the imprinted Igf2/Mpr gene［J］. *Nature*, **372**: 464-467.

Wilmut I. 1998. Cloning for medicine［J］. *Sci Am*, **279**: 58-63.

Young LE, Fernandes K, McEvoy TG, Butterwith SC, Gutierrez CG, Carolan C, Broadbent PJ, Robinson JJ, Wilmut1 I, Sinclair KD. 2001. Epigenetic change in *IGF-2R* is associated with fetal overgrowth after sheep embryo culture［J］. *Nat Genet*, **27**(2): 153-154.

本刊编委王跃招研究员简介

王跃招，男，1958 年生，1982 年四川大学生物系动物专业毕业（学士），1985 年中国科学院成都生物研究所两栖爬行动物专业研究生毕业（硕士），1987、1990 年在美国加州大学柏克利分校脊椎动物博物馆和加州科学院进修。现任中国科学院成都生物研究所知识创新基地研究员、两栖爬行动物研究室主任、IUCN/SSC（世界自然同盟/物种生存委员会）委员、国家濒危物种科学委员会委员、四川省动物学会理事长、四川省野生动植物保护协会常务理事、四川省生态学会常务理事等。

主要从事两栖爬行动物的系统发育、两栖爬行动物支序地理学、两栖爬行动物种群生态和保护生物学的研究工作，先后主持国家基金委、科学院和国际合作课题 20 余项，主要有：（1）青藏高原两栖爬行动物分布格局与高原隆升的关系；（2）蜥蜴类的分布格局与西部荒漠化过程的关系；（3）两栖类微分布格局与微生境变化的关系；（4）两栖类行为特征在水体污染检测中的应用；（5）高寒湿地两栖动物生态监测等。在国内外发表论文 50 余篇，两栖爬行动物科普译著 1 部。